Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für
Hautkrankheiten
Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. H. Röckl

ULTRAHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN AN MENSCHLICHEN SPERMATOZOEN BEI NORMOZOOSPERMIE UND VERSCHIEDENEN FERTILITÄTSSTÖRUNGEN

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

verfaßt und dem
Fachbereich Medizin
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Stephan Zieher
aus Künzelsau

Würzburg, 23. Februar 1979

1980

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für
Hautkrankheiten
Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. H. Röckl

ULTRAHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN AN MENSCHLICHEN SPERMATOZOEN BEI NORMOZOOSPERMIE UND VERSCHIEDENEN FERTILITÄTSSTÖRUNGEN

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

verfaßt und dem
Fachbereich Medizin
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Stephan Zieher
aus Künzelsau

Würzburg, 23. Februar 1979

Referent:	Professor Dr. med. J. Metz
Korreferent:	Professor Dr. med. H. Röckl
Dekan:	Professor Dr. med. O. Schrappe

Tag der mündlichen Prüfung: 14.2.1980

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin
der Universität Würzburg

MEINER FRAU

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	3
2.	ARBEITSGRUNDLAGEN	4
2.1	Elektronenmikroskopischer Aufbau der menschlichen Spermatozoen	4
2.2	Die untersuchten Enzyme im Stoffwechsel der Spermatozoen	5
2.1.1	Die saure Phosphatase	5
2.2.2	Die D-Fruktose 1-6 diphosphatase	6
3.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	8
3.1	Material und Methode	8
3.1.1	Aufbereitungsmethode zur Darstellung der sauren Phosphatase	10
3.1.2	Aufbereitungsmethode zur Darstellung der D-Fruktose 1-6 diphosphatase	11
3.2	Ergebnisse	13
3.2.1	Lokalisation der sauren Phosphatase der Spermatozoen normaler Ejakulate	16
3.2.2	Lokalisation der Reaktionsprodukte in Spermatozoen normaler Ejakulate nach Anwendung der Methode von SAITO und OGAWA	18
3.2.3	Vergleich der Lokalisation des Enzyms saure Phosphatase bei den verschiedenen Fertilitätsgruppen	19

Seite

3.2.4 Häufigkeit, Intensität und Lokalisation der nach der Anwendung der Methode von SAITO und OGAWA aufzufindenden Reaktionsprodukte in Spermatozoen bei verschiedenen Fertilitätsgruppen 22

3.2.5 Abbildungen und Tabellen 26

4. DISKUSSION 44

4.1 Allgemeine Bemerkungen zu der Methodik 44

4.1.1 Strukturerhaltung und Enzymaktivität 44

4.1.2 Lokalisation der Reaktionsprodukte 46

4.1.3 Intensität der Reaktionsprodukte 46

4.1.4 Spezifität der Reaktionsprodukte 47

4.2 Fehlerquellen der Untersuchung 49

4.3 Interpretation der Befunde 50

4.3.1 Die saure Phosphatase 50

4.3.2 Ergebnisse der Markermethode nach SAITO und OGAWA 52

5. ZUSAMMENFASSUNG 55

6. LITERATURVERZEICHNIS 58

1. EINLEITUNG

Eine vernünftige Familienplanung steht heute in vielen Bereichen im zentralen Interesse. Für manchen ist in diesem Zusammenhang die Perfektion der Geburtenverhütung unverständlich, weiß man doch um die Problematik unfruchtbarer Ehen und den gezielten Kinderwunsch vieler Ehepaare.

Tatsache ist ein stetiger Geburtenrückgang, der weitgehend in einer sozialen Umstrukturierung zu suchen ist. Andererseits wird der Personenkreis derjenigen, die den Arzt um Hilfe zur Erfüllung des Kinderwunsches fragen, immer größer.

Im Gegensatz zu früher, als die "Schuld" für die Kinderlosigkeit bei der Frau gesucht wurde (31), können heute aufgrund differenzierter Untersuchungsmöglichkeiten immer mehr Männer mit primären und sekundären Fertilitätsstörungen erfaßt werden.
Über biochemische und hormonelle Veränderungen bei Fertilitätsstörungen liegen zahlreiche Befunde vor, weniger jedoch über morphologische, ultrastrukturelle bzw. ultrahistochemische Parameter pathologischer Spermatozoen.

In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb an menschlichen Spermatozoen untersucht werden, ob Störungen der menschlichen Fertilität mit einer Änderung intrazellulärer Enzyme korreliert sein können.

Zur Klärung dieser Frage wurde versucht, die saure Phosphatase und die D-Fruktose 1-6 diphosphatase als Markerenzyme in ejakulierten Spermatozoen von gesunden und infertilen Männern ultrahistochemisch darzustellen.

2. ARBEITSGRUNDLAGEN

2.1 Elektronenmikroskopischer Aufbau der menschlichen Spermatozoen

Ausgereifte Spermatozoen bestehen aus Kopf, Mittelstück und Schwanzteil.

Der Nucleus ist rundlich-oval bis zugespitzt und beinhaltet nach E. LANDES und N. KAPESSER (17) eine inhomogene strukturierte Substanz, der eine genetische Information zugrunde liegt. Im apikalen Teil des Nucleus findet sich die Kernvakuole, die von manchen Autoren als Artefakt, von LANDES und KAPESSER (17) jedoch als "Hydrostatisches Organ" angesehen wird. Der Nucleus wird vom Akrosom umhüllt, das zwischen der inneren und äußeren Membran liegt. Beide Membranen vereinigen sich zu einer Doppelmembran, die sich auf die übrigen Spermatozoenanteile fortsetzt.

Nach HORSTMANN (14) und MORTON (23) enthält das Akrosom wesentliche Enzyme, unter anderem die saure Phosphatase, die für das Durchdringen der Zona pellucida eine entscheidende Rolle spielt. Das Halsstück, als Übergang zwischen Kopf und Mittelstück, enthält zwei Zentriolen. Das proximale ist als ein von neun Filamentenpaaren umgebenes Zentralkörperchen anzusehen und stellt sich lichtmikroskopisch als Halsplatte dar. Das distale Zentriol entspricht dem Kinetosum, an dem der Achsenfaden beginnt.
Im Mittelstück setzt sich der Achsenfaden, bestehend aus zwei zentralen Filamenten und neun ihn umgebenden Doppelfilamenten, sogenannten Außenfibrillen, fort. Diese sind mit den zentralen Filamenten durch radspeichenartige Fäden verbunden.

Der gesamte Fibrillenapparat wird von Mitochondrien, den Energielieferanten der Bewegung, spiralenförmig umgeben. Die enge Verbindung von Mitochondrien und Fibrillensystem verdeutlicht die Beziehung zwischen chemischer und kinetischer Energie des Mittelstücks.

Das Schwanzstück ermöglicht die Fortbewegung der Spermatozoen, die durch Kontraktilität der einzelnen Filamente zustande kommt. Das Schwanzstück unterteilt sich in ein Hauptstück und ein Endstück.
Das Hauptstück zeigt den Fibrillenapparat wie im Mittelstück. Diese kontraktilen Elemente werden zusätzlich von einer Fibrillenscheide umgeben, welche zum Endstück hin dünner wird und schließlich ausläuft.
Das Endstück selbst besteht lediglich aus dem von der Doppelmembran umgebenen Achsenfaden, da auch die Außenfibrillen nach distal hin an Dicke abnehmen und ganz aufhören (2, 13, 14, 16, 17, 32, 38).

2.2 Die untersuchten Enzyme im Stoffwechsel der Spermatozoen

2.2.1 Die saure Phosphatase

Die saure Phosphatase ist als Leitenzym der Lysosomen definiert (34). Es handelt sich um eine Phosphomonoesterase mit einem pH-Optimum um pH 5. Aus einer Vielzahl biochemischer und histochemischer Untersuchungen geht hervor, daß die saure Phosphatase an der Autolyse und Phagozytose teilhat (STEPHAN und BLÜMKE, 1971). Die saure Phosphatase ist kein einheitliches Enzym, nach WALTHER und HÖHN (37) zeigt sich eine Heterogenität aufgrund des sehr breiten pH-Optimums (3, 36, 37). In der Samenflüssigkeit der Säugetiere findet sich eine hohe Konzentration an saurer Phosphatase (37).

Diese wird nach MANN (19) in der Prostata gebildet. GUTMANN und GUTMANN (12) konnten zeigen, daß die Produktion hormonabhängig und der Steuerung der Leydig'schen Zwischenzellen unterworfen ist. KIPPING (15) führte jedoch den Nachweis, daß die saure Phosphatase nicht nur in der Prostata gebildet wird, sondern auch aus den Spermatozoen selbst stammt (15). In früheren Arbeiten (26) wurde versucht, eine Beziehung zwischen der sauren Phosphatase und der Motilität der Spermatozoen aufzustellen, was unseres Wissens bis jetzt noch nicht gelungen ist. So ist auch die Funktion der sauren Phosphatase in Spermatozoen noch nicht eindeutig geklärt.

Wie eingangs erwähnt, erhält das Akrosom für die Durchdringung der Eihaut wesentliche Fermente (2, 14, 23). Nach de DUVE (6) ist die saure Phosphatase ein lysosomales Enzym, das insofern für die Konzeption bedeutungsvoll ist, da es neben anderen Hydrolasen für die Auflockerung des Cervixpfropfes bzw. für die Andauung der Zona pellucida notwendig ist.

Saure Phosphatase wurde sowohl in bzw. an Akrosomen (1, 26, 35) als auch an zytoplasmatischen Strukturen (26, 35) von Säugetierspermatozoen nachgewiesen.

2.2.2 Die D-Fruktose 1-6 diphosphatase

Es ist hinreichend geklärt, daß auch die Säugetierspermatozoen ihre Energie aus der Glykolyse gewinnen, wenn ein genügendes Fruktoseangebot vorliegt und die Zelle in der Lage ist, die angebotene Fruktose glykolytisch zu

verwerten, wobei Milchsäure entsteht (19, 21, 25). Andererseits ist es denkbar, daß die Energiegewinnung auch bei genügendem Fruktoseangebot gestört sein kann, wenn die intrazellulär aufgenommene Fruktose nicht mehr glykolytisch, sondern in Richtung Glukoneogenese metabolisiert wird. Als ein Schlüsselenzym für eine "falsche Verwertung" der intrazellulären Fruktose in den Spermatozoen erscheint uns die D-Fruktose 1-6 diphosphatase, welche die Spaltung von D-Fruktose 1-6 diphosphat in D-Fruktose 6 phosphat und anorganischen Phosphor im Sinne der Glukoneogenese katalysiert (1, 5, 29).

Das erstmals 1943 von GOMORI (10) biochemisch nachgewiesene Enzym wurde 1968 von SAITO und OGAWA (29) in Leberparenchymzellen von Ratten elektronenoptisch dargestellt.

In Säugetierspermatozoen wurde dieses Enzym bisher noch nicht nachgewiesen.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Material und Methode

Zur Präparation kamen 110 Ejakulate, die in der hiesigen Poliklinik per masturbationem für fertilitätsdiagnostische Untersuchungen gewonnen wurden.

Das Alter der Patienten lag zwischen 20 und 50 Jahren. Die geforderte Karenz betrug 5 Tage.

Tab. 1: Altersverteilung der Patienten

Lebensalter	Anzahl der Patienten
18-20 Jahre	2
21-25 Jahre	29
26-30 Jahre	42
31-35 Jahre	37
36-40 Jahre	30
41-50 Jahre	2
51 Jahre	1

Vor der Präparation wurden Routineuntersuchungen für das Spermiozytogramm durchgeführt: Mengenbestimmung, Farbe, Geruch, Viskosität, Wiederverflüssigungszeit, Spermienzahl pro ml, Gesamtspermienzahl, Zahl der beweglichen Zellen, Qualität der Bewegung, Quantität der normalen und pathologischen Zellformen sowie quantitative Bestimmung des Fruktosegehaltes und pH-Bestimmung im Seminalplasma.

Die morphologische Beurteilung erfolgte nach der von SCHIRREN (31) angegebenen Einteilung.

Tab. 2: Nomenklatur nach SCHIRREN (31)

Nomenklatur	Spermienzahl Mill./ccm	Morphologie % normal	Motilität % normal
Normo-zoospermie	> 40	> 60	> 60
Oligo-zoospermie	< 40	> 60	> 60
Azoospermie	0	0	0
Astheno-zoospermie	> 40	> 60	< 60
Terato-zoospermie	> 40	< 60	< 60
Nekro-zoospermie	< 40	< 60	0
Aspermie	kein Ejakulat		

Da bei herabgesetzter Fertilität sowohl qualitative als auch quantitative Abweichungen häufig kombiniert auftreten, wurden unter Berücksichtigung der oben angegebenen Nomenklatur folgende Gruppen gebildet:

1. Normozoospermie
2. Oligozoospermie
3. Asthenozoospermie
4. Oligo-Asthenozoospermie
5. Astheno-Teratozoospermie
6. Oligo-Astheno-Teratozoospermie

Die nach diesen Kriterien ausgewählten Ejakulate mußten für den Enzymnachweis eine Mindestmenge von 2 ccm mit wenigstens 2 Millionen Zellen aufweisen, da sonst eine ausreichende Anzahl auszählbarer Spermatozoen im Elektronenmikroskop nicht zu erhalten war.

3.1.1 Aufbereitungsmethode zur Darstellung der sauren Phosphatase (nach ERICSSON und TRUMP)

Nach gründlicher Durchmischung und Abtrennung einzelner Portionen für die Bestimmung wird das Ejakulat mit 6,25% Glutaraldehydlösung in 0,067 m Cacodylatpuffer pH 7,4 30 Min. fixiert. Anschließend werden die Eiweißbestandteile für 10 Min. bei 500 Umdrehungen abzentrifugiert. Der hieraus gewonnene Überstand enthält die Spermatozoen, die sich bei nochmaligem Zentrifugieren bei 2000 U in 20 Min. absetzen. Das Sediment wird unter Zusatz von 0,1 m Cacodylatpuffer pH 7,4 mit Zumengung von 7,5 % Saccharose bei 0 - 4° C für wenigstens eine Stunde gelagert. Zwischendurch wird die Pufferlösung nach Abgießen der alten erneuert. Durch weitere Zentrifugation setzen sich die Zellbestandteile ab. Diese werden bei 37° C für 20 Min. inkubiert. Als Inkubationslösung dienen 25 ml 0,05 m Acetessigsäurepuffer pH 5,4, dem 0,03 g Bleicitrat zugefügt ist. Diese Lösung wird mit 2,5 ml einer 3 % Na-ß-Glycerophosphatlösung gemischt und bei 37° C 14 - 16 Std. stehen gelassen. Vor Gebrauch muß die Inkubationslösung filtriert werden und mittels 0,1 m NaOH oder 0,1 m HCl auf einen pH-Wert von 5,6 - 5,7 eingestellt werden.

Für Kontrollversuche wurde anstatt 2,5 ml Na-ß-Glycerophosphatlösung lediglich 2,5 ml Aqua dest. verwendet.

Nach Auswaschung mit 0,1 m Essigsäureacetatpuffer pH 5,6 erfolgt die zweite Fixation mit 1 % Osmium-S-Collidin pH 7,4 für 1 - 2 Stunden. Nach nochmaliger Überschichtung mit S-Collidin für 5 Min. erfolgt die Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe.

3.1.2 Aufbereitungsmethode zur Darstellung der D-Fruktose 1-6 diphosphatase nach SAITO und OGAWA

Nach Vorfixierung mittels 2 % Glutaraldehydlösung in 0,1 m Cacodylatpuffer pH 7,4 für 30 Min. bei 0 - 4° C erfolgt ebenfalls bei 500 U die Abzentrifugierung der Eiweißbestandteile von den Zellen. Nach Zentrifugierung bei 2000 U finden sich im Sediment die zellulären Bestandteile.

Nach kurzem Auswaschen mit 0,1 m Cacodylatpuffer pH 7,4 wird das Sediment mit der Inkubationslösung übergossen und 20 Min. bei Zimmertemperatur inkubiert.

Die Inkubationslösung wird hergestellt aus:

1,4 ml 0,2 m Tris-HCI Puffer pH 8,5
2,0 ml Aqua bidest.
2,1 mg D-Fruktose 1-6 diphosphat tri Natriumsalz
2,6 ml 0,015 m $MgSO_4$
4,0 ml einer gesättigten alkalischen Bleicitratlösung.

Diese Inkubationslösung wird dann mittels 0,1 m NaOH auf einen End-pH von 9,5 eingestellt.

Das für 20 Min. inkubierte Substrat wird dann mit 0,1 m Cacodylatpuffer pH 7,4 für 5 Min. ausgewaschen und erneut zentrifugiert.

Nun folgt bei 4° C für eine Stunde die Hauptfixierung mit 1 % gepufferter OsO_4, die mit 0,5 ml 2 % OsO_4 und 0,5 ml 0,1 m Veronalacetatpuffer angesetzt wird (nach SAITO und OGAWA).

Nach Auswaschung mit 0,1 m Cacodylatpuffer pH 7,4 erfolgt ebenfalls die Entwässerung in der Alkoholreihe. Hierbei werden sowohl die Aufbereitungsprodukte der sauren Phosphatase und der D-Fruktose 1-6 diphosphatase in der aufsteigenden Alkoholreihe von 50 % bis 100 % Alkohol für jeweils 15 Min. entwässert. Für Kontrollversuche wurden bei der Herstellung der Inkubationslösung 2,1 mg D-Fruktose 1-6 diphosphat-tri-Natriumsalz weggelassen.

Die Einbettung erfolgt nach LUFT (18) mittels eines alipathischen Epoxydharzes. Das Sediment wird hierbei zuerst mit 1 ml Propylenoxyd für 15 Min. bei 2000 U zentrifugiert.

Das Einbettungsmittel Epon läßt sich aus zwei Stammlösungen herstellen:

Stammlösung I	31 ml Epon 812
	50 ml DDSA
Stammlösung II	50 ml Epon 812
	44,5 ml MNA

Zu beiden Stammlösungen kommen als Härter 0,15 ml DMP 30 auf 5 ml. Das Sediment wurde insgesamt dreimal mit Epon überschichtet und dann 30 Min. bei 2000 U zentrifugiert. Das Sediment nach der letzten Zentrifugation wurde in eine Gelatinekapsel eingebracht und mit frisch angesetzter Eponlösung aufgefüllt und für 2 Tage bei 60° C polymerisiert.

Später wurde die Gelatine abgeweicht und die Harzblöcke wurden mit dem Pyramidon im Zentrum der Zellansammlung zugespitzt. Ultradünnschnitte von 70 nm Dicke wurden mit LKB I Ultra-Mikrotom gefertigt. Diese wurden auf mit selbst hergestellten Folien beschichtete Kupfernetze aufgebracht.

Die ultrastrukturelle Kontrolle und fotografische Dokumentation erfolgte mit dem Elektronenmikoskop Zeiss EM 9A.

Die hierbei gewonnenen Ergebnisse wurden am Recheninstitut der Universität Würzburg auf die Signifikanz der Unterschiede mittels des "Students-Testes" geprüft.

3.2. Ergebnisse

Abb. 1 zeigt die normale Sruktur eines menschlichen Spermatozoon ohne Enzymniederschlag. Es handelt sich um eine Kontrollreaktion, wie sie sowohl bei der sauren Phosphatase als auch bei der D-Fruktose 1-6 diphosphatase durchgeführt wurde. Die Strukturerhaltung war bei den Kontrollversuchen für die D-Fruktose 1-6 diphosphatase insgesamt etwas besser.

Zum Nachweis für die saure Phosphatase wurden 55 Ejakulate verwertet. Davon konnten aber nur 23 im Elektronenmikroskop ausgewertet werden, obwohl bei 29 Präparaten eine positive Reaktion klar zu erkennen war (Tab. 3). Dies beruht auf der Tatsache, daß bei 15 Präparaten keine oder keine sichere Reaktion zu erkennen war. Bei den übrigen 17 Proben waren zu wenig Zellen im Elektronenmikroskop auffindbar, um ein reproduzierbares Ergebnis zu erhalten (Tab. 3).

Tab. 3	Gesamtzahl d.Präparate	zu wenig Zellen	negativ	positiv	ausgezählt
Normozoospermie	7 + 1 K	1	3	4	3
Oligo-zoospermie	10 + 1 K	3	2	5	5
Astheno-zoospermie	12	1	5	6	6
Oligo-Astheno-zoospermie	7	3	0	5	4
Astheno-Terato-zoospermie	3	1	1	1	1
Oligo-Astheno-Teratozoospermie	15	7	4	8	4
Oligo-Terato-zoospermie	1	1	0	0	0
	55	17	15	29	23
Total	100 %	30,9 %	27,3 %	52,7 %	41,8 %

Von den 55 nach der Methode von SAITO und OGAWA verwerteten Ejakulaten konnten 22 ausgezählt werden. Die Zahl der positiven Reaktionen lag bei 34, wovon allerdings 5 unspezifischen Charakter hatten (siehe unten). Keine Reaktionen zeigten 12 der Präparate. In 16 Präparaten waren zuwenig Zellen enthalten (Tab. 4).

Tab. 4	Gesamtzahl d.Präparate	zu wenig Zellen	negativ	positiv	ausgezählt
Normozoospermie	12	2	3	9	7
Oligo-zoospermie	7	2	3	2	2
Astheno-zoospermie	15	0	5	10	5
Oligo-Astheno-zoospermie	8	3	1	5	4
Astheno-Terato-zoospermie	2	1	0	2	1
Oligo-Astheno-Teratozoospermie	10 + 1 K	7	0	5	3
Oligo-Teratozoo-spermie	1	1	0	1	0
	55	16	22	34	22
Total	100 %	29,1 %	21,8 %	61,8 %	40 %

Die Auszählung der Zellen im Elektronenmikroskop war zuerst so angelegt, daß eine diffuse und eine randständige Anordnung der Präzipitate mit unterschiedlicher Intensität berücksichtigt wurde. Eine semiquantitative Einteilung der Stärkegrade der Enzymlokalisation wurde zur

leichteren Trennung vorgenommen. "0" bedeutet: Kein Niederschlag und somit kein positiver Enzymnachweis, "1" schwache Reaktion, "2" mittelstarke Reaktion, "3" starke Reaktion (Tab. 9).

Bei den Kontrollversuchen im substratfreien Medium (bei saurer Phosphatase Fehlen von 2,5 ml 3 % Na-ß-Glycerophosphat und bei D-Fruktose 1-6 diphosphatase Fehlen von Fruktose 1,6 diphosphat) waren präzipitatähnliche Ausfällungen nicht nachweisbar.

Bei der Herstellung der Kontrollen wurde bis auf das Fehlen des Substrates im Inkubationsmedium genauso verfahren wie bei den übrigen Präparaten.

3.2.1 Lokalisation der sauren Phosphatase bei Spermatozoen normaler Ejakulate

Niederschläge der sauren Phosphatase finden sich in den Spermatozoen in verschiedener Stärke und Lokalisation. Grundsätzlich sind nicht in allen Zellen eines Präparates Präzipitate nachweisbar. Der Prozentsatz der Zellen mit positivem Niederschlag und dessen Intensität wechselt teilweise stark bei den einzelnen Gruppen.

Von den 300 ausgezählten Spermatozoen von Ejakulaten mit gesicherter Normozoospermie sind im Karyoplasma in 21,6 %, seltener am Nukleusrand, diffus verteilte Präzipitate von geringer Intensität (Stärke I) zu erkennen (Abb. 2, 3).

Inwieweit es sich hierbei um einen unspezifischen Niederschlag (Artefakt) handelt, soll in der Dikussion geklärt werden.

Die Akrosomen enthalten Präzipitate von schwacher und mittelstarker Intensität zu 31,85 % randständig und diffus zwischen den Membranen angeordnet (Abb. 4, 5).

Halsstücke weisen nur wenig Präzipitate auf, während in den Mittelstücken zu 26 % Niederschläge überwiegend diffus im Zytoplasma und weniger an den Membranstrukturen, seltener jedoch in den Mitochondrien zu sehen sind.

Dagegen sind die Reaktionsprodukte in den Schwanzstücken selten (ingesamt 7 %) und nur von geringer Intensität nachweisbar.
Einen hohen Prozentsatz mit recht unterschiedlicher Lokalisation und verschieden starker Intensität zeigen alle Varianten der Vorstufen (Tab. 5, Abb. 6).

Tab. 5 Enzymbesatz der Vorstufen (saure Phosphatase/Normozoospermie)

diffus:	40,8 % der Zellen
randständig:	52,3 % der Zellen

3.2.2 Lokalisation der Reaktionsprodukte in Spermatozoen normaler Ejakulate nach Anwendung der Methode von SAITO und OGAWA

Die Reaktionsprodukte stellen sich ähnlich wie beim Nachweis der sauren Phosphatase in unterschiedlicher Stärke und Lokalisation dar. Allerdings sind die Niederschläge bei gleicher Vergrößerung im Elektronenmikroskop feiner und klarer gezeichnet.
Wie bei der sauren Phosphatase sind die Präzipitate nicht in allen Zellen eines Präparates nachweisbar. Der Prozentsatz der Zellen mit positivem Niederschlag differiert auch hier bei verschiedenen Gruppen (Abb.7).

Im Karyoplasma finden sich nur wenig diffus verteilte Niederschläge (3,6 % der Köpfe).

Der größere Teil ist hier an den Membranstrukturen des Kernes (14,6 %) oder an der Akrosomeninnenmembran abgelagert (Abb. 8, 9).

Infolge schlechter Strukturerhaltung, bedingt durch die histochemische Präparation, lassen sich die Kernmembran und die Akrosomenmembran nicht immer trennen.

Im Bereich der Akrosomen tritt ein randständiger und ein diffuser Niederschlag zwischen der Akrosomenaußen- und -innenmembran bei 29,1 % der ausgewerteten Zellen von mittlerer Intensität auf (Abb. 8, 9).

In den Halsstücken der Spermatozoen sind Niederschläge in 3,75 % der ausgezählten Präparate diffus und strukturgebunden zu erkennen. Dagegen zeigen die Mittelstücke

nahezu gleichmäßig (85,4 %) eine deutliche Reaktion in den Mitochondrien, während im Zytoplasma Präzipitate in einem weitaus geringeren Prozentsatz (9,9 %) und dann auch nur im Bereich der Vesikel zu Darstellung kommen (Abb. 9).

Die Schwanzstücke sind überwiegend schwach-diffus (18,1 %) und manchmal auch randständig imprägniert.
In den Vorstufen sieht man eine mittelstarke Ausfällung besonders im Bereich der Mitochondrien und an den Membranstrukturen (78,9 %).

3.2.3 Vergleich der Lokalisation des Enzyms saure Phosphatase bei den verschiedenen Fertilitätsgruppen

In allen Gruppen kann bei ca. 20 % im Karyoplasma eine schwach-diffuse Reaktion festgestellt werden. In wieweit es sich hierbei um spezifische Niederschläge handelt, soll vorläufig nicht diskutiert werden. Nur ein geringer Teil zeigt randständige Anordnung. Dabei kann auch hier aufgrund der mangelnden Strukturerhaltung nicht eindeutig geklärt werden, ob es sich um Präzipitate an der Akrosomeninnenmembran handelt.

Im Bereich der Akrosomen befinden sich die Niederschläge der Stärke 1 und 2 randständig an der Außen- und Innenmembran, aber auch diffus zwischen beiden Membranen.

Im Vergleich der einzelnen Gruppen ergeben sich folgende Besonderheiten zwischen den aus normalen und pathologischen Ejakulaten gewonnenen Präparaten:

Spermatozoen der Gruppe der Oligozoospermie, der Asthenozoospermie und der Oligo-Asthenozoospermie zeigen in ca. 47 % eine positive Reaktion im Akrosom. Ein signifikanter Unterschied (97,5 % Signifikanz) besteht zwischen der Zahl der positiven Akrosomen der Normozoospermie mit 32 % und der Oligo-Astheno-Teratozoospermie mit 52 % enzympositiven Akrosomen.

Wie aus Tab. 10 weiter zu ersehen ist, unterscheiden sich auch Normozoospermie (32 %) und Astheno-Teratozoospermie (13 %); jedoch lag in dieser Gruppe nur Material von einem Patienten vor und es konnten somit nur 100 Zellen ausgezählt werden. Eine Signifikanz ließ sich statistisch nicht sichern (Tab. 10).

In den Halsstücken sind allgemein nur wenig und geringe aufsaure Phosphatase hinweisende Präzipitate zu beobachten, welche aufgrund von Zellzerstörungen nicht genau lokalisierbar sind.

Die Präzipitate in den Mittelstücken liegen überwiegend verstreut im Zytoplasma und in dessen Randstrukturen. In den Mitochondrien sind keine Niederschläge zu finden. Zwar unterscheiden sich die pathologischen Gruppen gegenüber der Normozoospermie, eine Signifikanz läßt sich jedoch nicht errechnen. Bei der Astheno-Teratozoospermie läßt sich ein signifikanter Unterschied aufgrund der ungenügenden Patientenzahl nicht sichern (Tab. 11).

In allen Gruppen stellen sich Präzipitate in den Schwanzstücken nur wenig dar. Vereinzelt sieht man Schwanzstücke mit diffuser und auch randständiger Anordnung. Ein signi-

fikanter Unterschied (95 %) ist zwischen der Normozoospermie mit 7 % positiven Schwanzstücken und der Oligo-Astheno-Teratozoospermie mit 13,5 % positiven Schwanzstücken zu erheben.

Am stärksten scheint die saure Phosphatase in den Zellbestandteilen des Ejakulates in den Präspermatiden vorzuliegen. Niederschläge aller Stärkegrade finden sich hier diffus, randständig und kombiniert angeordnet nebeneinander.

Die Präspermatiden von Patienten mit gesicherter Normozoospermie sind mit über 93 % positiver Zellen reich an saurer Phosphatase.

Wie aus Tab. 6 u.12 zu ersehen ist, finden sich Präzipitate der sauren Phosphatase in den Präspermatiden der pathologischen Ejakulate in einem geringeren Prozentsatz als bei der Normozoospermie.

Tab. 6 Prozentuale Häufigkeit präzipitathaltiger Vorstufen bei den verschiedenen Gruppen

	Häufigkeit der Präzipitate der sauren Phosphatase in % in Präspermatiden	Berechnete Signifikanz der Unterschiede zur Normozoospermie in %
Oligo-Astheno-Teratozoospermie	86 %	-
Astheno-zoospermie	76,7 %	95 %
Oligozoospermie	72,4 %	99,5 %
Oligo-Astheno-zoospermie	67,4 %	97,5 %
Astheno-Terato-zoospermie	39,7 %	-

3.2.4 Häufigkeit, Intensität und Lokalisation der nach der Anwendung der Methode von SAITO und OGAWA aufzufindenden Reaktionsprodukte in Spermatozoen bei verschiedenen Fertilitätsgruppen

Das Reaktionsprodukt ist im Kopfbereich der Spermatozoen vor allem an den Akrosomeninnen- und -außenmembranen lokalisiert. Darüber hinaus finden wir auch Präzipitate, die offensichtlich an der Kernmembran abgelagert sind. In einem Teil der Präparate ist nicht immer eindeutig zu unterscheiden, ob die Niederschläge an der Akrosomeninnenmembran oder an der Kernmembran lokalisiert sind.

Vergleicht man die verschiedenen Fertilitätsgruppen hinsichtlich der Häufigkeit des Vorkommens eindeutig randständiger nukleärer Niederschläge untereinander, so sind deutliche Unterschiede festzustellen.

Bei der Normozoospermie sind nukleäre Präzipitate in 18,1 % der ausgezählten Spermatozoen nachweisbar, während bei der Oligozoospermie in 39 %, bei der Asthenozoospermie in 43,4 %, bei der Oligo-Asthenozoospermie in 42 % und bei der Oligo-Astheno-Teratozoospermie in 38 % Reaktionsprodukte an der Kernmembran zu erkennen sind. Der Unterschied ist statistisch signifikant (Tab.7, 13).

Tab. 7	Nukleäre Präzipitate in %	Signifikanter Unterschied zur Normozoospermie
Normozoospermie	18,1 %	-
Oligozoospermie	39 %	90 %
Astheno-zoospermie	43,4 %	99,5 %
Oligo-Astheno-zoospermie	42 %	95 %
Oligo-Astheno-Teratozoospermie	38 %	95 %

In den Akrosomen sind die Präzipitate vor allem diffus zwischen den Membranen, aber auch randständig lokalisiert. Aus normalen Ejakulaten gefertigte Präparate ergeben nach der Methode von SAITO und OGAWA zu 29,1 % in den Akrosomen präzipitatähnliche Ausfällungen. Akrosomen aus der Gruppe der Asthenozoospermie mit einem Anteil von 45,4 % unterscheiden sich von der Normozoospermie deutlich mit einer Signifikanz von 95 %. Bei der Oligo-Asthenozoospermie sind 52,7 % der Akrosomen positiv. Die errechnete Signifikanz beträgt somit 97,5 %. Die Gruppe Astheno-Teratozoospermie hat mit 51 % ebenfalls eine starke Präzipitatausfällung, doch liegt hier nur ein Präparat vor und ein statistischer Unterschied läßt sich nicht sichern. Die Normozoospermie unterscheidet sich von der Oligo-Astheno-Teratozoospermie im Bereich der Akrosomen mit weniger als 95 % Signifikanz (Tab. 14).

In den Halsstücken normaler Spermatozoen finden sich mittels der von SAITO und OGAWA durchgeführten Reaktion zu 3,85 % Niederschläge. Die Enzymaktivität ist bei den Gruppen der verschiedenen Fertilitätsstörungen teilweise deutlich erhöht (Tab. 8).

Tab. 8	Prozentuale Häufigkeit der Reaktionsprodukte in den Halsstücken
Normozoospermie	3,75 %
Oligozoospermie	21,6 %
Asthenozoospermie	13,7 %
Oligo-Astheno-zoospermie	37,4 %
Astheno-Terato-zoospermie	23,8 %
Oligo-Astheno-Teratozoospermie	12,0 %

In den Mittelstücken aller Gruppen sind kräftige Niederschläge überwiegend in den Mitochondrien nachweisbar. Dagegen sind die Reaktionsprodukte im Zytoplasma bedeutend dünner verteilt und an Vesikel gebunden (Abb. 9). Die Zahl der positiven Mittelstücke in den einzelnen Gruppen unterscheidet sich nicht (Tab. 15).

Die diffus und randständig beladenen Schwanzstücke machen bei der Normozoospermie 24,7 % der ausgezählten Zellen aus.

Bei der Oligozoospermie sind 35,5 % positiv, bei der Asthenozoospermie 51,2 % (Signifikanz von 95 %), bei der Oligo-Asthenozoospermie 64,3 % positiv (Signifikanz von 99,5 %). Bei der Astheno-Teratozoospermie sind 24 % positiv (für die Unterschiedsberechnung zu wenig Patienten). Die Oligo-Astheno-Teratozoospermie weist 48,3 % positiver Schwanzstücke mit einer Signifikanz von 97,5 % auf (Tab. 16).

Mit Ausnahme der Astheno-Teratozoospermie weisen alle Gruppen im Bereich der Schwanzstücke einen dichteren Enzymbesatz im Vergleich zur Normozoospermie auf.

In den Vorstufen sind die Ausfällungen aller Stärkegrade hauptsächlich in den Mitochondrien, teilweise aber auch verstreut im Zytoplasma und an den biologischen Membranen zu finden (Tab. 17).

3.2.5 Abbildungen und Tabellen

Abb. 1: Normozoospermie, saure Phosphatase.
Kontrollversuch im substratfreien Medium.
Längsschnitt durch Kopf, Halsstück, Mittelstück.
Vergr. 15.000fach

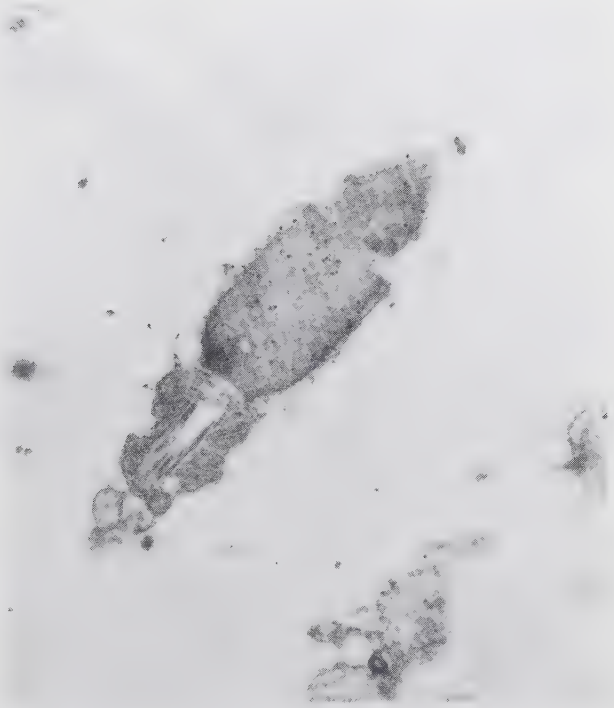


Abb. 2: Normozoospermie, saure Phosphatase.
Längsschnitt durch Kopf, Halsstück und Mittelstück.
Enzymaktivität im Bereich des Kopfes und des Akrosomes.
Vergr. 15.000fach

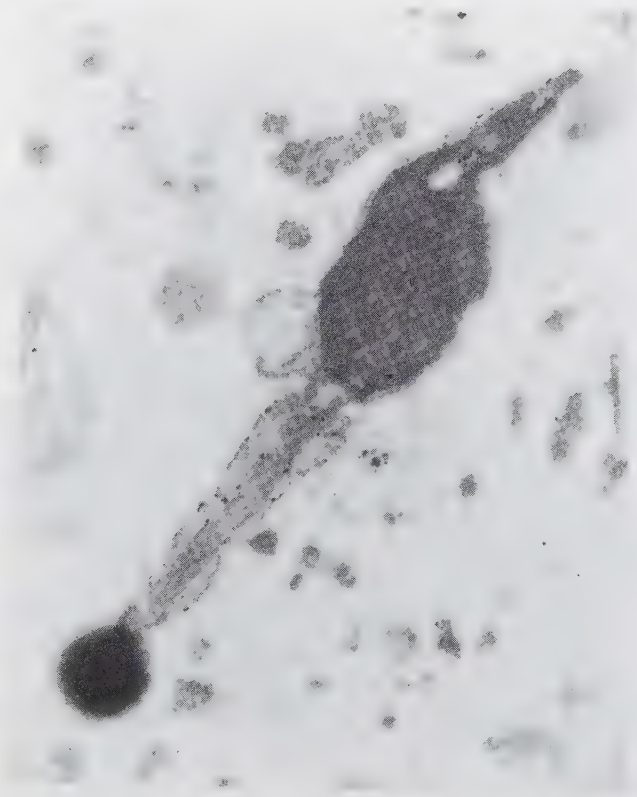


Abb. 3: Normozoospermie, saure Phosphatase.
Längsschnitt durch Kopf, Halsstück und Mittelstück.
Enzymaktivität im Bereich des Kopfes, des Akrosomes und des Mittelstückes
Vergr. 16.500fach

Abb. 4: Normozoospermie, saure Phosphatase.
Längsschnitt durch Kopf, Halsstück, Mittelstück und Schwanzstück.
Enzymaktivität randständig im Bereich der Membranstrukturen.
Vergr. 15.000fach

Abb. 5: Normozoospermie, saure Phosphatase.
Querschnitt durch einen Kopf.
Enzymaktivität überwiegend im Bereich des Akrosomes.
Vergr. 39.900fach

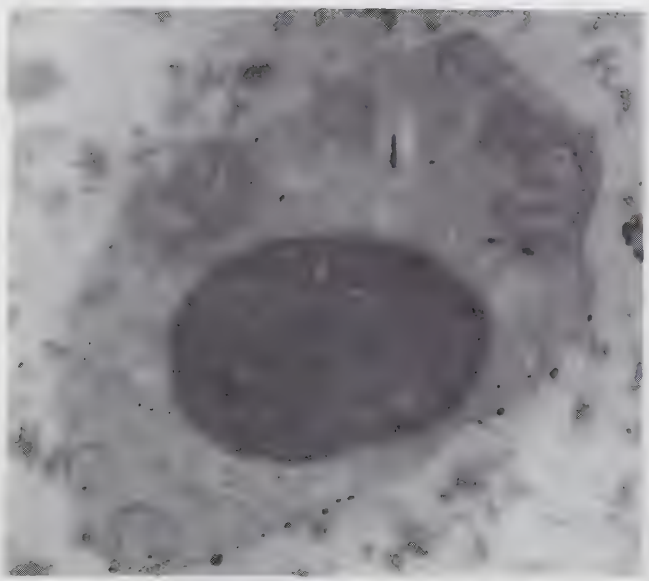


Abb. 6: Normozoospermie, saure Phosphatase.
Querschnitt durch eine Präspermatide.
Enzymaktivität in diffuser Verteilung.
Vergr. 31.500fach

Abb. 7: Normozoospermie.
Reaktionsprodukt nach Methode von SAITO und OGAWA (29).
Längsschnitt durch Kopf, Halsstück und Mittelstück.
Reaktionsprodukt am Kopf randständig und in den Mitochondrien des Mittelstückes sowie vereinzelt im Zytoplasma.
Vergr. 15.600fach

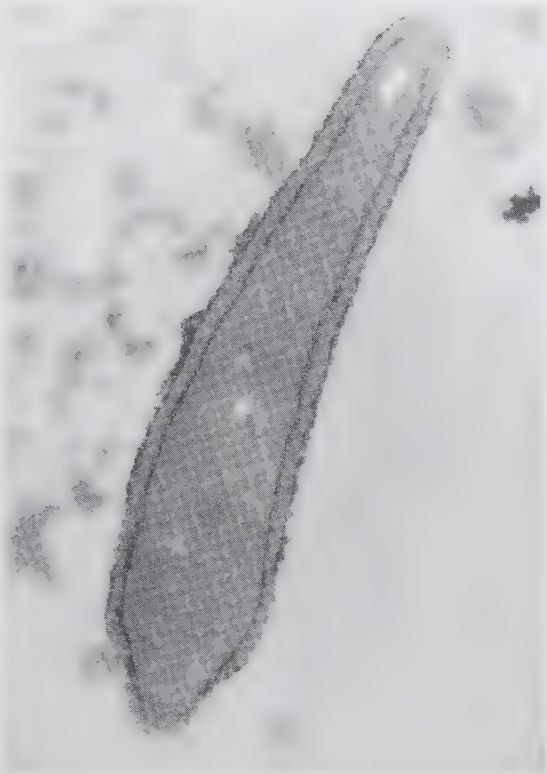


Abb. 8: Normozoospermie.
Reaktionsprodukt (Methode von SAITO und OGAWA).
Längsschnitt durch einen Kopf.
Reaktionsprodukt randständig am Kopf, im Bereich des Akrosomes und im Bereich der Membranstrukturen.
Vergr. 44.720fach

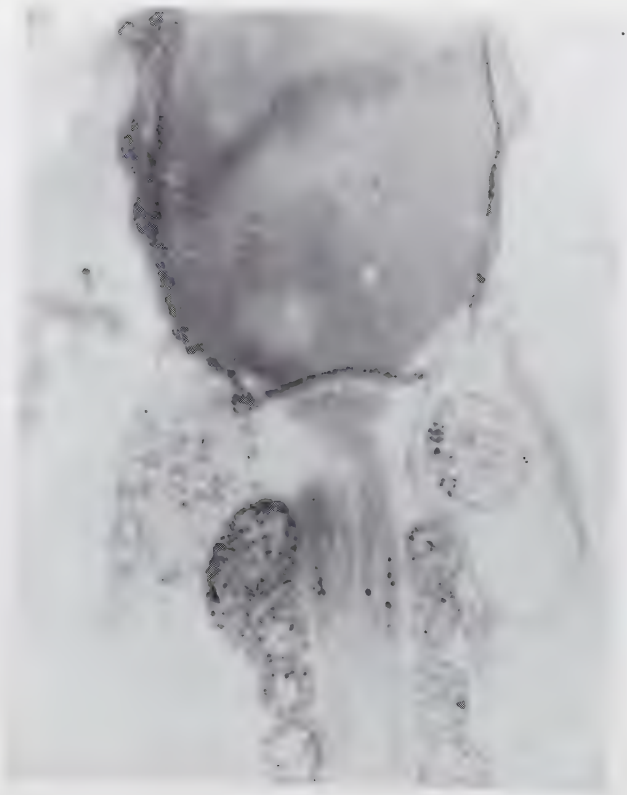


Abb. 9: Normozoospermie.
Reaktionsprodukt (Methode von SAITO und OGAWA).
Längsschnitt durch Kopf und Mittelstück.
Reaktionsprodukt randständig am Kopf, im Mittelstück, im Bereich der Mitochondrien und im Cytoplasma.
Vergr. 46.800fach

Erläuterung der graphischen Darstellung

Normozoospermie	N
Oligozoospermie	O
Asthenozoospermie	A
Oligo-Asthenozoospermie	OA
Astheno-Teratozoospermie	AT
Oligo-Astheno-Teratozoospermie	OAT

Zahl der ausgezählten Zellen einer Gruppe Z

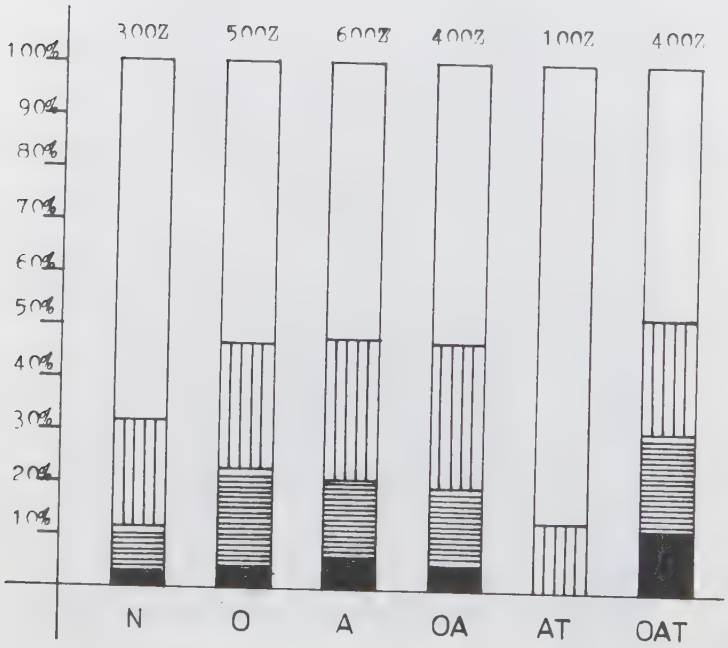
keine Enzymreaktion (0)

schwache Enzymreaktion (1)

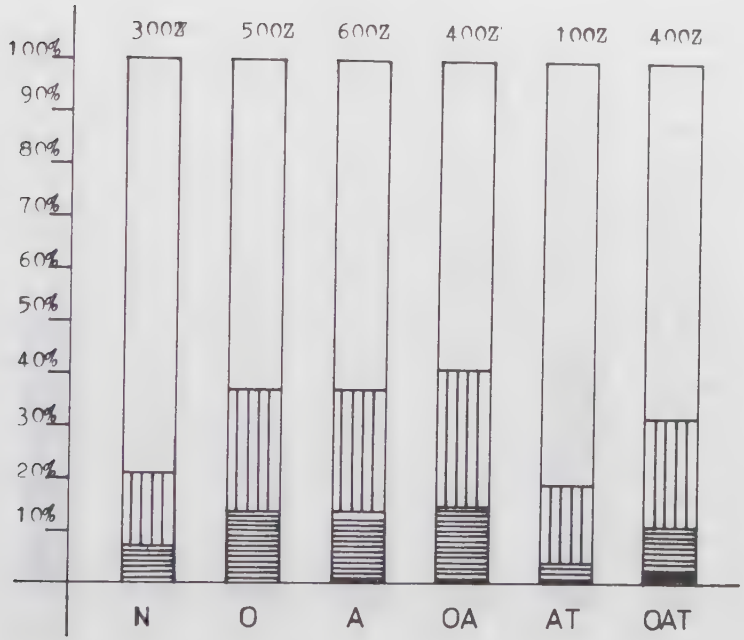
mittelstarke Enzymreaktion (2)

starke Enzymreaktion (3)

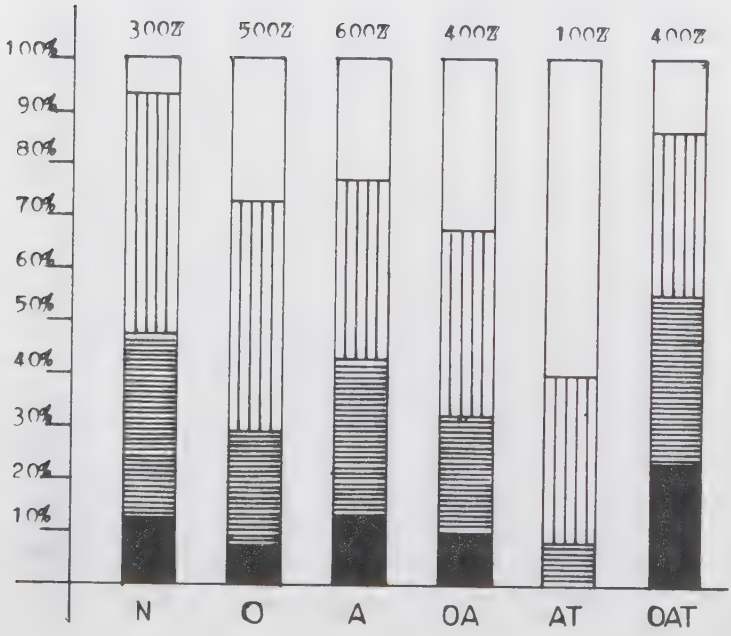
Tab. 10: Saure Phosphatase.
Prozentuale Häufigkeit der
enzympositiven Akrosomen.



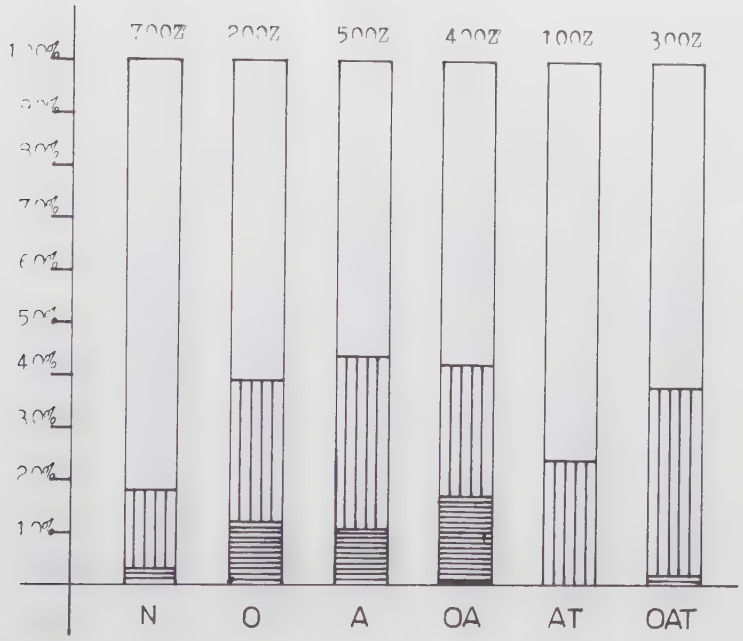
Tab. 11: Saure Phosphatase.
Prozentuale Häufigkeit der
enzympositiven Mittelstücke.



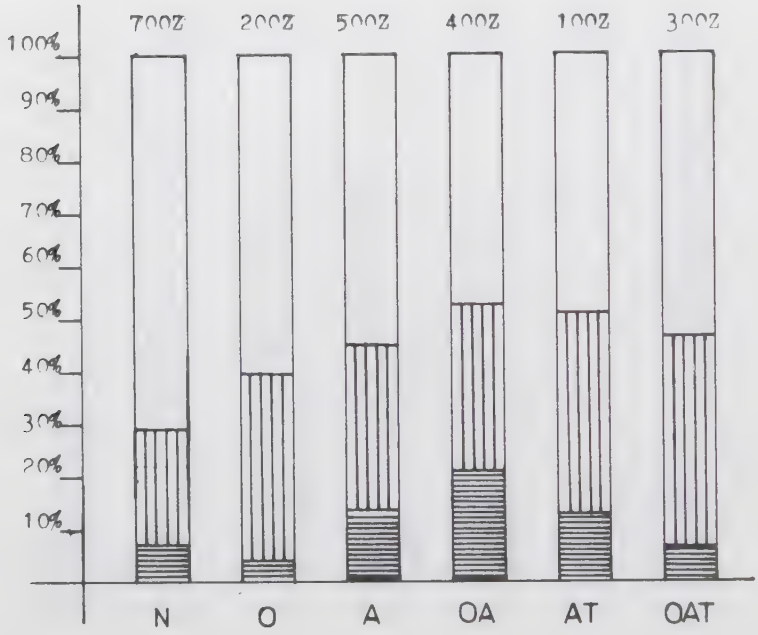
Tab. 12: Saure Phosphatase.
Prozentuale Häufigkeit der
enzympositiven Vorstufen.



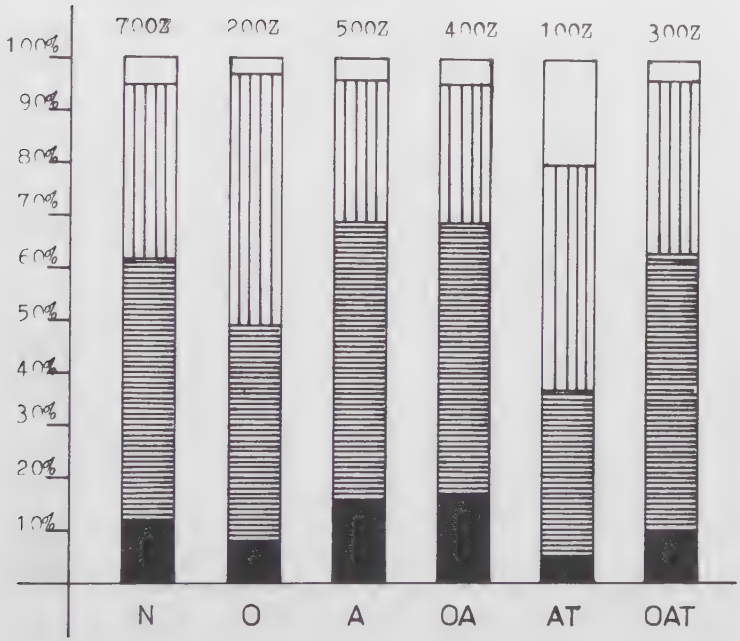
Tab. 13: Prozentuale Häufigkeit der Reaktionsprodukte im Bereich der Spermatozoenköpfe (Methode SAITO und OGAWA)



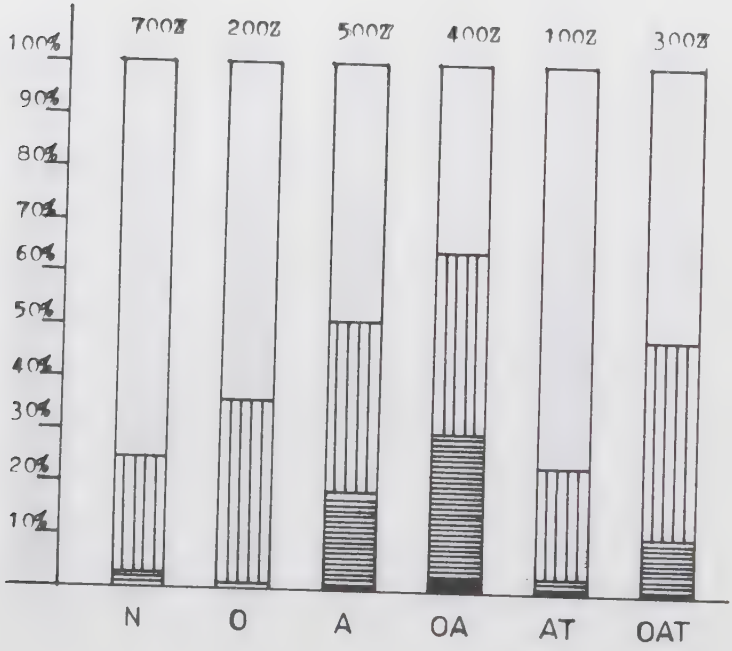
Tab. 14: Prozentuale Häufigkeit der Reaktionsprodukte im Bereich der Akrosomen (Methode nach SAITO und OGAWA)



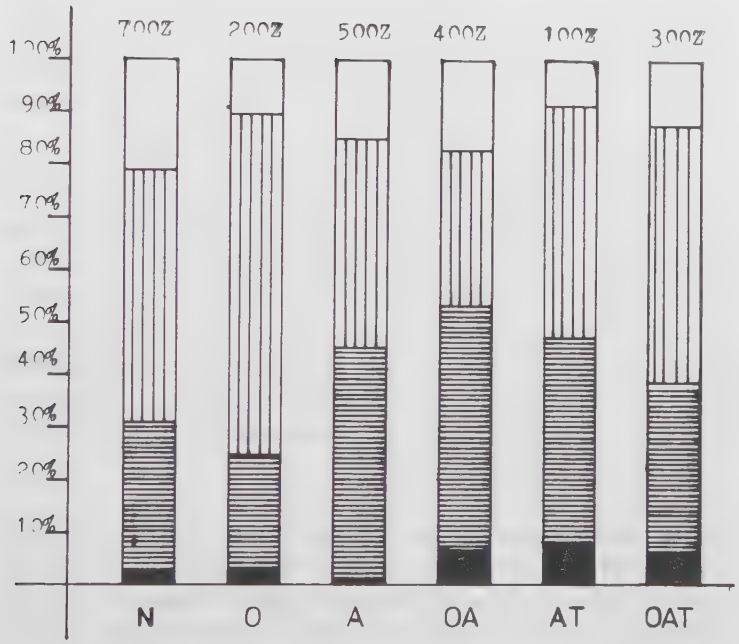
Tab. 15: Prozentuale Häufigkeit der Reaktionsprodukte im Bereich der Mittelstücke (Methode nach SAITO und OGAWA)



Tab. 16: Prozentuale Häufigkeit der Reaktionsprodukte im Bereich der Schwanzstücke (Methode nach SAITO und OGAWA)



Tab. 17: Prozentuale Häufigkeit der Reaktionsprodukte im Bereich der Vorstufen (Methode nach SAITO und OGAWA)



4. DISKUSSION

4.1 Allgemeine Bemerkungen zu der Methodik

Bei Anwendung ultrahistochemischer Nachweisverfahren ist die Strukturerhaltung der zu untersuchenden Zellen bzw. der Zellorganellen wesentlich, vor allen Dingen im Hinblick auf eine genaue Lokalisation der Reaktionsprodukte und deren Intensität. Eine weitere wichtige Voraussetzung zur Interpretation der Befunde ist die Spezifität der Nachweisverfahren.

4.1.1 Strukturerhaltung und Enzymaktivität

Histochemische Nachweismethoden für Enzyme sind in der Mikroskopie seit langem im Gebrauch. Für die Verwendung in der Elektronenmikroskopie ergeben sich jedoch oftmals Schwierigkeiten, da einerseits für die genaue Lokalisation der Enzyme die Strukturerhaltung der Zelle von Bedeutung ist (28), andererseits durch die Aufbereitung für die Elektronenmikroskopie Gewebszerstörungen auftreten können.

Durch Zentrifugation der Spermatozoen bei 2000 U/Min. bis zu 30 Min. kommt es zur Schädigung der Zellen, besonders im Bereich der Mittelstücke. Weiterhin ist zu beachten, daß die Anwendung besonderer Fixationsverfahren oftmals einen Verlust der Enzymaktivität nach sich ziehen kann.

Nach REIMER (28) ist diese Tatsache sogar wünschenswert, da man sonst zu plumpe, nicht verwertbare Reaktionsprodukte findet. Mit der von uns gewählten Glutaraldehydvorfixierung, die eine relativ gute Strukturerhaltung gewährleistet, ist nach REIMER mit einem Aktivitätsverlust von ca. 25 % zu rechnen.

Bei nicht genügender Fixierung von Gewebsblöcken können Diffusionsartefakte auftreten (27). In der vorliegenden Arbeit werden keine Gewebsblöcke verwendet, sondern eine durch Zentrifugation zusammengebackene Zellansammlung mit unvollkommen ausgewaschenen Begleitsubstanzen, wobei eine genügende Durchfixierung nicht unbedingt gegeben ist. Trotzdem ließ sich bei unseren Präparaten häufig beobachten, daß extrazelluläre Präzipitate vorhanden waren, während in den Spermatozoen der Enzymnachweis nicht gelang.

In einem Teil der untersuchten Ejakulate war die Spermatozoendichte so gering, daß sich nicht sicher klären ließ, ob die Enzymnachweisverfahren angegangen waren. Obwohl im Gegensatz zur Gefrierfixation bei der OsO_4 Fixierung die Strukturerhaltung weitgehend gewährleistet ist, können nach ZAMBONI und STEFANINI (38) bei dieser Methode Zellveränderungen auftreten. Die Plasmamembranen sind geschwollen, aufgequollen und können in Bruchstücken vorliegen. Bei derartigen Auswirkungen auf die Zelloberfläche müssen auch Veränderungen der Zelle an sich in Erwägung gezogen werden.

4.1.2 Lokalisation der Reaktionsprodukte

Die Reaktionsprodukte sowohl der sauren Phosphatase und die mittels der Methode nach SAITO und OGAWA (29) aufzufindenden Präzipitate sind fein granuliert und finden sich im Bereich der gesamten Spermienzelle, im Zytoplasma, teilweise auch im Karyoplasma sowie an der Zellmembran und in Zellorganellen. Weiter läßt sich beobachten, daß nicht in allen Zellen eines Präparates Präzipitate zur Darstellung kommen.

SEEMANN und PALADE (33) diskutieren hierfür eine Permeabilitätsstörung der Membranen für das Substrat unter Versuchsbedingungen.

Reaktionsprodukte, besonders der sauren Phosphatase, finden sich auch extrazellulär. Hierbei handelt es sich wohl um markierte Prostataphosphatasen.

4.1.3 Intensität der Reaktionsprodukte

Die Untersuchungsbefunde zeigen, daß die Stärke der Reaktionsprodukte innerhalb der einzelnen Gruppen unterschiedlich ausgeprägt ist. Ebenso findet sich innerhalb eines Präparates in verschiedenen Zellen eine variable Intensität, gelegentlich ist auch kein Reaktionsprodukt nachweisbar. Neben der zytoplasmatischen Lokalisation der Präzipitate sind überwiegend die Randstrukturen stark markiert.

Nach NEWMANN et al. (22) ist nicht auszuschließen, daß es sich hierbei zum Teil um unspezifische Niederschläge von Blei handelt, da sich Bleisalze wegen ihrer starken Affinität zu Zytomembranen, dort vermehrt anlagern.

4.1.4 Spezifität der Reaktionsprodukte

Als Nachweismethode der sauren Phosphatase wurde die Bleisalzmethode nach ERICSSON und TRUMP (7) verwendet. Die hierbei zu erkennenden Präzipitate entsprechen den Befunden von ERICSSON und TRUMP. Kontrolluntersuchungen im substratfreien Medium ergaben keine Reaktionsprodukte.

Niederschläge im Seminalplasma und in Zellkernen, die möglicherweise nach längerer Inkubation auftreten können, sind nicht von zytoplasmaspezifischen Bleiphosphatablagerungen zu unterscheiden, was jedoch nicht gegen die Spezifität der Methode spricht (22). GOLDFISCHER et al (9) wiesen in diesem Sinne saure Phosphatase auch im endoplasmatischen Retikulum, an Zytomembranen und Außenmembranen nach.

Nach GOLDFISCHER et al. (9) sowie REALE und LUCIANO (27) sind derartige Befunde nur so zu erklären, daß entweder Bleiphosphat nach erfolgter Enzymreaktion oder die saure Phosphatase vor der Reaktion an die Membranen gewandert sind.

Desweiteren entsprechen die in dieser Arbeit gefundenen Befunde weitgehend anderen Autoren (11, 35), die eine ähnliche Lokalisation der sauren Phosphatase bei Säugetierspermatozoen beschrieben haben.

Bis zur Beendigung des Literaturstudiums für diese Arbeit im Sommer 1976 lag uns noch kein Nachweis der D-Fruktose 1-6 diphosphatase an männlichen Keimzellen vor. Grundlage einer Diskussion kann somit nur die Arbeit von SAITO und

OGAWA (29) sein, die die D-Fruktose 1-6 diphosphatase elektronenoptisch dargestellt haben, allerdings an Leberparenchymzellen von Ratten. Sie fanden die D-Fruktose 1-6 diphosphatase hauptsächlich im Zytoplasma und bei höherer Auflösung auch an filamentären Strukturen der Leberparenchymzellen gebunden, und nicht in den Mitochondrien. Bei der D-Fruktose 1-6 diphosphatase handelt es sich somit um ein rein zytoplasmatisches Enzym.
In dieser Arbeit fanden sich in den Mitochondrien sogar signifikant mehr Niederschläge als im Zytoplasma. Das elektronenoptische Bild entspricht weitgehend den von SAITO und OGAWA beschriebenen Präzipitaten.

Die von uns an Spermatozoen nach der Methode von SAITO und OGAWA durchgeführten Untersuchungen ergaben somit eine andere Lokalisation der Reaktionsprodukte. Neben Niederschlägen im Zytoplasma sind die Präzipitate vor allem an subzellulären Strukturen wie Mitochondrien und Akrosomen zu finden.

Aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation (Zytoplasma, Mitochondrien) der Präzipitate stellt sich die Frage, ob die nach der Methode von SAITO und OGAWA dargestellten Reaktionsprodukte tatsächlich das Enzym D-Fruktose 1-6 diphosphatase wiedergeben. Es ist nicht auszuschließen, daß mit dieser Methode noch andere Phosphatasen, z.B. eine nicht näher differenzierte alkalische Phosphatase nachgewiesen wurde. Einer Klärung dieser Frage wurde hier nicht weiter nachgegangen.

Bei Weglassen des enzymspezifischen Substrates blieben jedoch bei sonst gleichen Versuchsbedingungen die Niederschläge aus.

Somit sind die nachgewiesenen Reaktionsprodukte nur als Marker bestimmter subzellulärer Strukturen von Spermatozoen anzusehen, wobei die Natur der Präzipitate offen bleiben muß.

4.2 Fehlerquellen der Untersuchung

Abhängig von der Zentrifugation zur Spermienanreicherung bei 2000 U/Min. bestand für die Markermethode eine wesentliche Fehlerquelle.

Weiter ist nicht auszuschließen, daß ein aufgrund der Probenbeschaffenheit nicht optimal einzustellender pH-Wert die Ergebnisse verfälscht hat und somit auch andere Enzyme unter diesen pH-Bedingungen zur Darstellung kamen (evtl. eine alkalische Phosphatase bei der Methode nach SAITO und OGAWA).

Dieser pH-Fehlerquelle gegenüber ist der subjektive Fehler bei der semiquantitativen Auswertung wohl von untergeordneter Bedeutung. Eine weitere Fehlermöglichkeit ist darin gegeben, daß Gewebszerstörungen durch die Aufbereitung und die Fixierung unvermeidbar waren, wodurch eine exakte Lokalisation der Reaktionsprodukte nicht immer möglich war.

Für den Nachweis der sauren Phosphatase kommt die Instabilität der 3 % Na-ß-Glycerophosphatlösung hinzu, ähnlich für den D-Fruktose 1-6 diphosphatase-Nachweis die leichte Zersetzlichkeit des Fruktose 1-6 diphosphat tri-Natriumsalzes.

4.3 Interpretation der Befunde

4.3.1 Die saure Phosphatase

Elektronenoptische Untersuchungen zum Nachweis der sauren Phosphatase an Spermatozoen liegen vor von GORDON und BARNETT (11) sowie von TEICHMANN und BERNSTEIN (35). GORDON und BARNETT (11) wiesen 1967 die saure Phosphatase an Spermatozoen von Ratten und Meerschweinchen nach. So wie hier bei menschlichen Spermatozoen konnten sie in Ratten- und Meerschweinchenspermatozoen die saure Phosphatase nicht in Mitochondrien, sondern an Membranstrukturen des Mittelstückes, im Zytoplasma und an den Schwanzstücken darstellen. Ein Nachweis im Bereich des Kopfes und im Akrosom erfolgte bei GORDON und BARNETT nicht.
In Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen haben TEICHMANN und BERNSTEIN (35) nach der Gomorischen Methode die saure Phosphatase im Bereich des Nucleusrandes, im Akrosom, in der Umgebung der Mitochondrien und in den Schwanzstücken von Hasen- und Bullenspermatozoen dargestellt.

Bei unseren Untersuchungen fanden wir die Präzipitate einer Nachweisreaktion des Enzymes saure Phosphatase im Bereich der Spermatozoenköpfe, dort vor allen Dingen

an und in Akrosomen. In geringer Intensität erfolgte der Nachweis auch an anderen Zellstrukturen.

Die im Karyoplasma nachgewiesenen Präzipitate von nur geringer Intensität sind möglicherweise auf eine Überinkubation zurückzuführen und somit als unspezifisch anzusehen.

Als spezifisch sind meines Erachtens jedoch jene Präzipitate zu interpretieren, welche sich an der Kernmembran, innerhalb der Akrosomen und an der Akrosomenaußenmembran finden, da das Reaktionsprodukt stärker ausfiel als im Kern.

Auffallend ist ein oft starker Enzymbesatz der Akrosomenaußenmembran. Offensichtlich wurde hierbei zusätzlich eine aus dem Seminalplasma stammende Phosphatase markiert.

Biochemische Studien von ALLISON (1) zeigen in den Akrosomen von Säugetierspermatozoen, die mittels Zentrifugation gewonnen wurden, ebenfalls saure Phosphatase.

Weiter gelang es 1973 BRYAN et al (4), im Phasenkontrastmikroskop die saure Phosphatase in Akrosomen von Mäusespermatozoen zu zeigen.

Ein elektronenoptischer Vergleich der einzelnen Fertilitätsgruppen ist nach Durchsicht der Literatur bisher nicht angestellt worden. SCHIRREN (31) ist aufgrund biochemischer Untersuchungen der Ansicht, daß bei den einzelnen Fertilitätsstörungen im Verhalten der sauren Phosphatase kein Unterschied vorliegt.

NUN et al.(24), die 1972 die Aktivität der sauren Phosphatase biochemisch bei Männern mit gesicherter Normozoospermie, Oligozoospermie und weiteren unklassifizierten Fertilitätsstörungen und bei der Azoospermie untersuchten, fanden im Seminalplasma von der Normozoospermie zunehmend zu der Azoospermie eine deutliche Zunahme der Aktivitäten der sauren Phosphatase.

Obwohl in der vorliegenden Arbeit die saure Phosphatase in den Spermatozoen selbst bestimmt worden ist und nicht im Seminalplasma, ist auch bei uns eine Zunahme der Dichte der sauren Phosphatase von der Normozoospermie zur Azoospermie festzustellen. Vernachlässigt man hierbei eine mögliche Anlagerung der Seminalplasmaphosphatase an der Zellmembran, so zeigt sich, daß bei pathologischen Spermatozoen auch intrazellulär vermehrt saure Phosphatase vorliegt.

Ohne statistische Signifikanz ist eine Zunahme der Reaktionsstärke der auf die saure Phosphatase hinweisenden Präzipitate festzustellen, wenn die Beweglichkeit eingeschränkt und die Morphologie verändert ist.

4.3.2 Ergebnisse der Markermethode nach SAITO und OGAWA

Zur Erörterung der Präzipitate, welche nach der Methode von SAITO und OGAWA gefunden wurden, liegt uns nur die Originalarbeit von SAITO und OGAWA vor (29), welche die D-Fruktose 1-6 diphosphatase im Zytoplasma von Leberparenchymzellen nachgewiesen haben. Das Reaktionsprodukt kann nicht mit Sicherheit als D-Fruktose 1-6 diphosphatase angesehen werden, da auch biochemische Ar-

beiten die zytoplasmatische Lokalisation betonen (20). Aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation ist das Reaktionsprodukt dieser Nachweisreaktion also nur als Markersubstanz zur Differenzierung männlicher Fertilitätsstörungen anzusehen. Die Reaktion eignet sich jedoch, um bestimmte Strukturen in den Spermatozoen deutlich darzustellen und ist vor allem in solchen Spermatozoen besonders ausgeprägt vorhanden, bei denen die Beweglichkeit eingeschränkt ist. So finden sich zum Beispiel auch bei der Normozoospermie zu 20 % Präzipitate im Bereich der Akrosomen, was in etwa der Anzahl pathologischer Spermatozoen bei Ejakulaten von Probanden mit gesicherter Normozoospermie entspricht.

In unserer Arbeit ergibt sich hieraus statistisch eine Korrelation zwischen der Stärke des Reaktionsproduktes, der prozentualen Häufigkeit markierter Zellen und den im Spermiozytogramm feststellbaren pathologischen Veränderungen.

So sind bei allen Gruppen, bei denen die Beweglichkeit eingeschränkt ist, sowohl im Bereich der Akrosomen, als auch in den Schwanzstücken mehr Präzipitate zu finden. Im Vergleich zur Normozoospermie (ca. 20 %) finden sich bei der Asthenozoospermie und den bewegungsschwachen Gruppen in ca. 50 % der ausgezählten Zellen Enzymniederschläge.

Die Reaktionsprodukte nach der Methode von SAITO und OGAWA finden sich im Bereich der Spermatozoenköpfe hauptsächlich in und an den Akrosomen (Abb. 7, 8, 9). Im Karyoplasma selbst sind keine Niederschläge zu sehen.

In den Mittelstücken der Spermatozoen sind Präzipitate überwiegend in den Mitochondrien, selten dagegen im Zytoplasma zu finden (Abb. 9).

In der unmittelbaren Frage der Unterscheidungsmöglichkeit normaler und pathologischer Spermatozoen scheint uns diese Markerreaktion ultrastrukturell durchaus eine Antwort zu geben.

Somit bedeutet diese Untersuchung eine Erweiterung der bisherigen Differenzierungsverfahren für Spermatozoen. Wegen des Aufwandes der Untersuchung eignet sich das Verfahren selbstverständlich nicht für Routineuntersuchungen.

Für besondere Fragestellungen, insbesondere für Untersuchungen des Spermastoffwechsels scheint es jedoch ein Weg, der durch weitere Untersuchungen gesichert werden muß.

Die in der Einleitung gestellte Frage, ob die mit der Methode nach SAITO und OGAWA gefundenen Reaktionsprodukte in bewegungsschwachen Spermatozoen einen Hinweis für eine gestörte Fruktolyse bzw. einen Hinweis für eine "falsche Verwertung" geben, läßt sich anhand der vorliegenden Befunde nicht beantworten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In einer Untersuchung von 110 Ejakulaten, abgegeben von 55 Patienten, wurde geprüft, ob mit Hilfe des ultrahistochemischen Nachweises der sauren Phosphatase und der D-Fruktose 1-6 diphosphatase (nach der Methode con SAITO und OGAWA) im Spermiozytogramm zusätzliche Informationen über die Normozoospermie, die Oligozoospermie, die Asthenozoospermie sowie die Mischformen erbracht werden können.

Zum Nachweis der sauren Phosphatase diente eine Modifikation der Gomorischen Methode mit 3 % Na-ß-Glycerophosphat als Medium.

Zum Nachweis der D-Fruktose 1-6 diphosphatase wurde das Verfahren nach SAITO und OGAWA mittels des tri-Natriumsalzes des D-Fruktose 1-6 diphosphates angewandt.

Entsprechende Kontrollversuche im substratfreien Medium ergaben die Substratspezifität des Verfahrens, trotz der die Genauigkeit belastenden Fehlerquellen des Verfahrens.

Die saure Phosphatase fand sich hauptsächlich im Bereich des Akrosoms und im Zytoplasma.

Es zeigte sich, daß bei Ejakulaten hypofertiler Männer mehr saure Phosphataseaktivität ultrahistochemisch in Akrosomen und im Zytoplasma zu erkennen war.

Die nach der Methode von SAITO und OGAWA gefundenen Präzipitate fanden sich in und am Akrosom und überwiegend in den Mitochondrien der Mittelstücke. Die stärkste Enzymaktivität boten hierbei die Gruppen mit verminderter Beweglichkeit der Spermatozoen. Es konnte nicht geklärt werden, ob mit dieser Methode das von SAITO und OGAWA angegebene Enzym nachgewiesen wurde.

Die Methode eignet sich jedoch, um funktionell und morphologisch geschädigte Spermatozoen zu markieren und somit von normalen Spermatozoen abzugrenzen.

Insgesamt ergab die Arbeit, daß ultrahistochemische Untersuchungen einen weiteren diagnostischen Schritt zur Differenzierung männlicher Fertilitätsstörungen bieten.

Die möglichen Fehlerquellen der Untersuchungsverfahren werden diskutiert und ein Vergleich mit den in der Literatur enthaltenen Angaben versucht.

Beim Referenten, Herrn Professor Dr. med. Jost METZ , möchte ich mich für die Überlassung des Themas und für seine verständnisvollen Hinweise bedanken.

Dem Direktor der Klinik, Herrn Professor Dr. med. Helmut RÖCKL, danke ich im besonderen für die freundliche Übernahme des Korreferates und für die Möglichkeit, an seiner Klinik arbeiten zu dürfen.

Ebenfalls zu Dank verpflichtet bin ich Fräulein SCHENK für die Hilfe bei der Materialaufbereitung und -auswertung.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1 ALLISON, A.C. and HARTREE, E.F. Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization. J.Reprod.Fertil. 21, 501-515 (1970)

2 ÅNDBERG, A. The ultrastructure of the human spermatozoon. Acta.obstet.gynec.scand. 36, 4-133 (1957)

3 BLANK, M. Der histochemische Nachweis von sauren Phosphatasen im Zentralnervensystem. Fortschr.d.Medizin 87, 351-352 (1969)

4 BRYAN, J., UNNITHAN, R. Cytochemical localization of non-specific-esterase and acid phosphatase in spermatozoa of the mouse. Histochemie 33, 169-180 (1973)

5 BUDECKE, E. Grundriß der Biochemie. Berlin 1971 Walter de Gruyter u. Co.

6 DE DUVE, Ch. The lysosome concept. In: Ciba Foundation Symposion on Lysosomes 1-31 Little, Brown, Boston (1963)

7 ERICSSON, J.L.E. and TRUMP, B.F. Observationes on the application of electron microscopy, of the lead phosphate technique for the demonstration of acid phosphatase. Histochemie 4, 470-487 (1964-1965)

8 ESSNER, E. and NOVIKOFF, A.B. — Localization of acid phosphatase in hepatic cells by means of electron microscopy. J.Biophys.Biochem.Cytol. 9, 773-784 (1961)

9 GOLDFISCHER, S., ESSNER, E. and NOVIKOFF, A. — The localization of phosphatase activities at the level of ultrastructure. J.Histochem.Cytochem. 12, 72-95 (1964)

10 GOMORI, G. — Hexosediphosphatase. J.Biol.Chem. 148, 139-149 (1943)

11 GORDON, M. and BARNETT, R.J. — Fine structural cytochemical localizations of phosphatase activities of rat and guinea pig. Expl.Cell Res. 48, 395-412 (1967)

12 GUTMANN, A.B. and GUTMANN, E.B. — Acid phosphatase activity of the semen of normal human subjects. Proc.Soc.exp.Biol. 38, 470-473 (1938)

13 HAMMEN, R., SCHULZ-LARSEN, J. and CARLSEN, F.E. — Electron microscopy of human spermatozoa Fertil.and Steril. 5, 411-420 (1954)

14 HORSTMANN, E. — Neue Ergebnisse der Andrologie. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1965)

15 KIPPING, D. — Über die Phosphatasen des menschlichen Samens. Clinica Chimica acta 33, 409-413 (1971)

16 LANDES, E. Elektronenoptische Untersuchungen über menschliche Spermatozoen im ultradünnen Schnitt. Arch.klin.exp.Derm. 211, 149-150 (1960)

17 LANDES, E. und KAPESSER, W. Elektronenoptische Untersuchungen über Ultrastruktur des menschlichen Spermatozoenkerns. Hautarzt 9, 463-466 (1958)

18 LUFT, J.H. Improvements in epoxy resin embedding methods. J.Biophys.Biochem.Cytol. 9, 409-414 (1961)

19 MANN, T. The biochemestry of semen. Methuen, London (1954)

20 MENDICINO, J. and VASARHELY, F. Renal D-Fruktose 1-6 Diphosphatase. The Journal of Biological Chemestry 238, 11, 3528-3534 (1963)

21 MOHRI, H., MOHRI, T. and ERNSTER, L. Isolation and enzymic properties of the midpiece of bull spermatozoa. Expl.Ce.Res. 38, 217-246 (1965)

22 NEWMANN, B.E., KABAT, E.A. and WOLF, A. Histochemical studies on tissue enzymes V.A. difficulty in enzyme localization in the acid range due to selective affinity of certain tissues for lead, its dependance on ph. Amer.J.Path. 26, 483-498 (1950)

23 MORTON, D.B. Lysosomal enzymes in mammalian spermatozoa Fawcet in Div.Biol. 5, 204-255 (1976)

24 NUN, S., MUSACCHIO, I. EPSTEIN, J.A. Variations in seminal plasma constituents from fertile, subfertile, and vasectomized azoospermic men, Fert.and Steril.23, 357-36o(1972)

25 PETERSON,R.N. and FREUND, M. Profile of glycolytic enzyme activities in human spermatozoa, Fertil. and Steril.21, 151-158 (197o).

26 POSALKI,Z., SZABO,D., BACSI,E., ÖKRÖS,I. Hydrolytic enzymes during spermatogenesis in rat; an electron microscopic and histochemical study, J. Histochem.Cytochem. 16 249-262 (1966).

27 REALE,E. and LUCIANO,C. Fixierung mit Aldehyden. Ihre Eignung für histologische und histochemische Untersuchungen in der Licht- und Elektronenmikroskopie, Histochemie 23, 144-17o (197o)

28 REIMER.L. Elektronenmikroskopische Untersuchungs- und Präparationsmethoden, Berlin,Heidelbg.,New York 1967. Springer Verlag

29 SAITO T. and OGAWA, K. Ultracytochemical demonstration of D-Fruktose - 1,6-Diphosphatase (D-Fruktose, 1,6-Diphosphatase 1-Phosphohydrolase)activity in the rat liver using lead citrate as capture reagent, Journal of Microscopie 7, 521-532 (1968)

30 SCHIMMEL, G. und VOGEL, W.
Methodensammlung der Elektronenmikroskopie.
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1973)

31 SCHIRREN, C.
Praktische Andrologie.
Berlin (1971) Verlag Brüder Hartmann

32 SCHULZ-LARSEN, J.
The morphology of the human spermatozoa.
Electron microscopic investigations of the ultrastructure.
Acta path.microbiol.scand., supply 128 (1958)

33 SEEMANN, Ph.M. and PALADE, G.E.
Acid phosphatase localization in rabbit eosinophils.
J.Cell.Biol. 34, 745-756 (1967)

34 STEPHAN, R. und BLÜMCKE, S.
Elektronenhistochemischer Nachweis der sauren Phosphatase in Keimzentren menschlicher Tonsillen.
Zschr.f.Zellforschung 115, 114-136 (1971)

35 TEICHMANN, R.J. and BERNSTEIN, M.H.
Fine structure localizations of acid phosphatase in rabbit and bull sperm heads.
J.Reprod.Fertil. 27, 243-248 (1979)

36 VERNON,C. AQ., GAULDIE,J. and HANSON,J.M. — Acid phosphatase, Nature 2o8,382-383 (1965)

37 WALTHER.G. und HÖHN, P. — Diselectrophoretischer Nachweis der Heterogenität der menschlichen sau/ren Phosphatase, Andrologie 3, 77-8o (1971)

38 ZAMBONI,L. and STEFANINI,M. — On the configuration of the plasma membrane of the mature spermatozoon, Fertil. and Steril, 19, 57o-579 (1968).

L E B E N S L A U F

13.4.1948	als Sohn des Dr. med. Wilhelm Zieher und seiner Ehefrau Elfriede Zieher, geb. Walz, in Künzelsau (Bad.Württ.) geboren
1955	Einschulung in Stuttgart
1959	Übertritt in das Zeppelin-Gymnasium in Stuttgart
1964	Wechsel an die Schloß-Schule in Kirchberg/Jagst
8.6.1968	Reifeprüfung
WS 1968/69 und SS 1969	Studium der Biologie an der Universität Hohenheim
1.1o.1969 - 15.4.197o	Grundwehrdienst in Passau
SS 197o	Aufnahme des Medizinstudiums an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
29.7.1976	Medizinisches Staatsexamen an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
15.9.1976- 14.9.1977	Medizinalassistentenzeit am Kreiskrankenhaus Marktheidenfeld (6 Monate Chirurgie, 6 Monate Innere)
27.9.1977	Approbation
15.9.1977- 28.11.1977	Praxisvertretung
28.11.1977- 31.7.1978	Restwehrdienst als Truppenarzt in Veitshöchheim
seit 1.8.1978	Assistent an der chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Marktheidenfeld
seit 31.7.197o	mit der Lehrerin Ute Zieher, geb. Kling, verheiratet; aus unserer Ehe gingen bisher 3 Kinder hervor.

Mein Ziel ist die Facharztanerkennung als Arzt für Allgemeinmedizin mit späterer Niederlassung in einer Landpraxis .

S. Zieher

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80